

INTERNATIONAL PATENT OFFICE
WORLD ORGANIZATION FOR INTELLECTUAL PROPERTY

International patent published on
the basis of the Patent Cooperation Treaty (PCT)
INTERNATIONAL PUBLICATION NO. WO 98/47518

International Patent Classification ⁶ :	A 61 K 31/715
International Filing No.:	PCT/EP98/02284
International Filing Date:	April 17, 1998
International Publication Date:	October 29, 1998
Priority	
Date:	April 17, 1997
Country:	DE
No.:	197 16 120.0

USE OF CHOLESTEROL-LOWERING AGENTS TO INFLUENCE SIGNAL
TRANSDUCTION PROCESSES IN THE CELL MEMBRANE AND IN THE PROPHYLAXIS
OR TREATMENT OF PRION-ASSOCIATED DISEASES OR ALZHEIMER'S DISEASE

Inventor; and
Inventor/Applicant (only for US):

Kai Simons [FI/DE]
Kleinschmidtstrasse 27
D-69115 Heidelberg (DE)

Applicant (for all designated
states except US):

Europäisches Laboratorium für
Molekular-Biologie (EMBL)
[DE/DE]
Meyerhofstrasse 1
D-69117 Heidelberg (DE)

Agent:

H. Weickmann et al.
Kopernikusstrasse 9
D-81679 Munich (DE)

Designated States:

JP, US, European Patent (AT, BE,
CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB,
GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

International Publication No. WO 98/47518

Job No.: 1655-83253

Translated from German by the Ralph McElroy Translation Co.
910 West Avenue, Austin, Texas, 78701

Published

With International Search Report.

Before expiration of the period permitted for amendments to the claims. Will be republished if amendments are submitted.

Abstract

The invention relates to the use of cholesterol-lowering agents in the prophylaxis or treatment of diseases based on conformational change of prions and Alzheimer's disease as well as for influencing signal transduction processes in the cell membrane.

FOR INFORMATION ONLY

Codes for the identification of PCT contract states on the cover sheets of the documents that publish the international applications in accordance with the PCT.

AL	Albania	KG	Kyrgyzstan	TM	Turkmenistan
AM	Armenia	KP	Democratic People's	TR	Turkey
AT	Austria		Republic of Korea	TT	Trinidad and Tobago
AU	Australia	KR	Republic of Korea	UA	Ukraine
AZ	Azerbaijan	KZ	Kazakhstan	UG	Uganda
BA	Bosnia-Herzegovina	LC	Saint Lucia	US	United States of
BB	Barbados	LI	Liechtenstein		America
BE	Belgium	LK	Sri Lanka	VN	Vietnam
BF	Burkina Faso	LR	Liberia	YU	Yugoslavia
BG	Bulgaria	LS	Lesotho	ZW	Zimbabwe
BJ	Benin	LT	Lithuania		
BR	Brazil	LU	Luxembourg		
BY	Belarus	LV	Latvia		
CA	Canada	MC	Monaco		
CF	Central African	MD	Republic of Moldavia		
	Republic	MG	Madagascar		
CG	Congo	MK	Macedonia (former		
CH	Switzerland		Yugoslavian Republic		
CI	Côte d'Ivoire		of Macedonia)		
CM	Cameroon	ML	Mali		
CN	China	MN	Mongolia		
CU	Cuba	MR	Mauritania		
CZ	Czech Republic	MW	Malawi		
DE	Germany	MX	Mexico		
DK	Denmark	NE	Niger		
EE	Estonia	NL	Netherlands		
ES	Spain	NO	Norway		
FI	Finland	NZ	New Zealand		
FR	France	PL	Poland		
GA	Gabon	PT	Portugal		
GB	United Kingdom	RO	Romania		
GE	Georgia	RU	Russian Federation		
GH	Ghana	SD	Sudan		
GN	Guinea	SE	Sweden		
GR	Greece	SG	Singapore		
HU	Hungary	SI	Slovenia		
IE	Ireland	SK	Slovakia		
IL	Israel	SN	Senegal		
IS	Iceland	SZ	Swaziland		
IT	Italy	TD	Chad		
JP	Japan	TG	Togo		
KE	Kenya	TJ	Tajikistan		

This invention concerns the use of cholesterol-reducing agents for prophylaxis or treatment of diseases that involve a conformational change of prions, or of Alzheimer's disease.

For most molecular biologists who are concerned with membrane proteins the function of lipids lies mainly in their ability to serve as solvent for proteins (Singer & Nicolson, *Science* 175 (1972), 720-731). However, this is not their only role. The different types of lipids are arranged not only in a fluid double layer, but they are also asymmetrically distributed over the exoplasmic and cytoplasmic membrane regions (Bretscher and Raff, *Nature*, 258 (1975), 43-49; Roelofsens & Op den Kamp, *Plasma Membrane Phospholipid Asymmetry and its Maintenance: The Human Erythrocyte as a Model* 1-7-46 (1994)). In addition, it was found that the lipids are also organized in a certain way and thus carry out more regulation tasks than was previously known (Glaser, *Curr. Op. Struct. Biol.* 3 (1993), 475-481, Thomas et al., *J. Cell Biol.* 125 (1994), 195-802, Kusumi & Sako, *Curr. Opin. Cell Bio.* 8 (1996), 566-574). It now turned out that a lateral organization of lipids results through the combination of sphingolipids and cholesterol into shifting flocs or rafts, to which proteins can specifically attach within the double layer. The existence of such sphingolipid-cholesterol rafts leads to a fundamentally different evaluation of the membrane organization and allows new insights into the function of cell membranes.

The models shown in Figure 1B were developed on the basis of research into such sphingolipid-cholesterol rafts. The starting point is that the sphingolipid head groups, which occupy larger areas of the plane of the exoplasmic part of the membrane than the hydrocarbon chains of the lipids in the membrane layer, allow the development of intermediate spaces that become filled by cholesterol molecules, which function as, so to say, spacers (Figure 1B). A dense joining together of these sphingolipid-cholesterol clusters to the exoplasmic part of the membrane allows them to function as the overall arrangement within the membrane double layer. It is important to establish here that the sphingolipids normally have a long fatty acid (C₂₀-C₂₆) which is attached to the sphingosine base via an amide bond, where, because of its length, the fatty acid can join to the cytoplasmic part of the double layer of the membrane. Since cholesterol is present in both membrane layers, it is also possible that the molecule will act as a spacer in the cytoplasmic part of the membrane and, in doing so, fill the intermediate spaces between fatty acids present there (Figure 1B). The new findings on the organization of sphingolipids and cholesterol in the cell membrane have now led to the recognition that in this there could also be a basis for treatment or prevention of diseases that involve a change of conformation of prion proteins or even Alzheimer's disease. Such diseases are still not treatable, for the most part even detecting them is very difficult, and in most cases absolute certainty can be obtained only by an autopsy after the death of the patient. From that standpoint there is a compelling need for a possibility of treating such diseases, at least in a suspected case, or of preventing their development.

For this reason the task of this invention was to make available a possibility of being able to have a positive effect on diseases like Alzheimer's disease or other diseases in which a change of proteins on sphingolipid-cholesterol rafts takes place.

This task was solved in accordance with the invention through the use of cholesterol lowering agents for prophylaxis or treatment of diseases that stem from a change of conformation of prions, or of Alzheimer's disease. All agents that lower the cholesterol level in the blood and are used or can be used for this purpose for prevention of other diseases, above all arteriosclereosis and heart attack, can be used as cholesterol lowering agents. Examples of cholesterol lowering agents include the active agent lovastatin (Mevinacor, Mevinolin, Monacolin-K, MK-803) as well as other drugs for treating hypercholesterolemia such as pravastatin-sodium, simvastatin, bezafibrate, clofibrate, etofylline clofibrate, xenofibrate, gemfibrozyl, etofibrate, colestipol-HCl, colestyramine, xantinol nicotinate, icositol nicotinate, probucol and the like. Lovastatin inhibits cholesterol biosynthesis on the basis of mevalonic acid. It is already being used as a drug to treat hypercholesterolemia, where it is administered in doses up to 20 mg/day. The dosages of cholesterol lowering agents in accordance with the invention are known or can easily be determined by the specialist.

Another possible manner and way of lowering the cholesterol level is to affect the regulation of cholesterol metabolism. The distribution of cholesterol on sphingolipid-cholesterol rafts is much higher than its distribution in areas in which there are no rafts. In the endoplasmic reticulum, where the cellular cholesterol content is perceived and regulated, there are practically no rafts. Sphingolipid-cholesterol rafts do not flow back from the Golgi apparatus to the endoplasmic reticulum. The lowering of the cholesterol level first affects the cholesterol not contained in rafts, which leads to less cholesterol flowing back to the endoplasmic reticulum. By reducing, for example, the sphingolipid content, it would then be possible to simultaneously lower the cholesterol synthesis in the cell, since more cholesterol can flow back to the endoplasmic reticulum. This can occur, for example, through sphingolipid synthesis inhibitors.

The disease scrapie, which occurs in sheep, is seen above all at the present time as a disease that derives from a change of conformation of prion proteins. Also, this invention may be important for the BSE problem, if it is confirmed that the triggering factor for the ultimate fatal disease is also a change of conformation of prion proteins and that this disease of cows can be transferred to humans. Therefore, treatment of Creutzfeld-Jacob disease would also be an object of this invention.

The scrapie prion protein PrP^{Sc} is the only known component of a transmissible prion that is known up to now. It is derived from a protein PrP^{C} that is normally anchored to glycosyl phosphatidyl inositol (GPI) and is expressed in neurons, where the prion protein PrP^{Sc} , which is protease resistant, arises through a conformational change of PrP^{C} . Presumably, this change of

conformation takes place on sphingolipid cholesterol rafts. The change of conformation appears to be dependent on the GPI anchoring, since chimeric proteins that contain a characteristic transmembrane domain are not subject to the conformational change. PrP^{C} is insoluble in Triton X-100 at 4°C during the conformational change, and a depletion of cellular cholesterol hinders the formation of PrP^{Sc} . Interestingly, PrP^{C} can be transferred into the cell via clathrin-coated vesicles by means of endocytosis, presumably due to bonding to a still unknown transmembrane protein with a so-called coated pit signal. This binding possibly keeps the PrP^{C} at a distance from the rafts, where the still unelucidated $\text{PrP}^{\text{C}} \rightarrow \text{PrP}^{\text{Sc}}$ transformation appears to take place.

One of the important characteristics of the pathogenesis of Alzheimer's disease is progressive cerebral accumulation of amyloid β -peptide ($\text{A}\beta$), a proteolytic cleavage product of an amyloid precursor protein (APP). Newly synthesized APP is directed into the axons in the neurons and then carried further to the dendrites by transcytosis. During the intercellular transport APP is subject to a number of cleavages, in which either the amyloid fragment $\text{A}\beta$ or a non-amyloid, secreted form APP_{sec} (secreted) is released. In the cleavage to APP_{sec} by α -secretase (α -cleavage) an 8 kD transmembrane fragment remains in the cell membrane. The cleavage of APP to $\text{A}\beta$ takes place in two steps. First a 10 kD fragment of APP is produced through the so-called β -cleavage and is then cleaved again within the transmembrane domain (γ -cleavage), which results in $\text{A}\beta$. Like PrP^{C} , a part of the APP in neurons is also insoluble in Triton X-100, a property that the GPI anchored proteins and transmembrane proteins that bind to sphingolipid rafts also have. Where exactly the $\text{A}\beta$ production takes place is not clear, but recently obtained results indicate that $\text{A}\beta$ complexes to a lipid in sphingolipid cholesterol rafts, the GM1 ganglioside, which is found in the earliest disease manifestations in the brain. Interestingly, a small part of APP is also found in detergent-insoluble, glycolipid-enriched complexes, the so-called DIGs (Brown & Rose, *J. Cell*, 68 (1992), 533-544; Parton & Simons, *Science*, 269 (1995), 1398-1399). Possibly APP is fixed into the rafts by binding to GM1 and proteolysis may possibly take place in the sphingolipid-cholesterol microdomains, so that $\text{A}\beta$ that is bound to GM1 results. The $\text{A}\beta$ peptide is localized in the APP molecule exactly where it is to be expected if one assumes that this region binds to a glycosphingolipid. Another interesting connection to the sphingolipid-cholesterol rafts is the recently obtained result that $\text{A}\beta$ binds to the receptor for glycanization end products (Yan et al., *Nature*, 382 (1996), 685-691), of which it was established that they associate with DIGs and caveolae in endothelial cells (Lisanti et al., *Developm. Biol.* 6 (1995), 47-58).

It was established in the scope of this invention that the use of cholesterol-lowering agents has a positive effect on the diseases mentioned above. This is possibly due to a lowering of the number of rafts in the plasma membranes and thus a lowering of the number of possible anchoring points, at which a change of conformation of proteins then takes place.

The realization in accordance with the invention that cholesterol-lowering drugs have a positive effect on Alzheimer's disease or diseases like Creutzfeld-Jacob disease allows for the first time a treatment possibility that attacks the causes of the disease.

Moreover, through the use of cholesterol-lowering agents in accordance with the invention it appears in general possible to affect signal transduction processes in cells from outside. It was recently shown that many proteins that are found in sphingolipid-cholesterol rafts play an important role in signal transduction (Parton & Simons, *Science*, 269 (1995), 1398-1399; Anderson, *Proc. Natrl. Acad. Sci. USA*, 90 (1993), 10909-10913; Lisanti et al., *Trends Cell Biol.*, 4 (1994), 231-235).

Through the development of sphingolipid-cholesterol rafts a subcompartmentalization is brought about on the cell membrane and leads to different structures developing, thus rafts of different sizes and intermediate spaces without raft structure.

Raft formation is not possible without cholesterol and, as far as that goes, many signal transduction operations are thus dependent on the presence of cholesterol. The following may be mentioned as examples of such operations: signal transduction via heterotrimer G proteins (Li et al., *J. Biol. Chem.*, 270 (1995), 15693-15701), Ras (Song et al., *J. Biol. Chem.*, 271 (1996), 9690-9697; Mineo et al., *J. Biol. Chem.*, 271 (1996), 11930-11935) and ceramides (Liu & Anderson, *J. Biol. Chem.*, 270 (1995), 27179-27185). Examples of signal transduction processes in which rafts play a role as platforms are immunoglobulin E signal processes in allergic reactions, T cell receptor signal processes, LPS endotoxin signal processes, signal processes of endothelial NO synthase, signal processes via tyrosine kinases like Lyn and Fyn, which are doubly acylated and via trimer G proteins that contain doubly acylated subunits, and transfer signals via GPI-anchored proteins.

Another object of this invention is thus the use of cholesterol-lowering agents to affect signal transduction processes at the cell membrane.

Description of figures

Figure 1 shows a cell membrane in cross section. A shows a detail with rafts that contain proteins bound to the exoplasmic layer of the membrane by means of their GPI anchors. B shows an enlargement of a sphingolipid-cholesterol raft.

Figure 2 shows that the removal of cholesterol inhibits the production and secretion of $A\beta$. a shows an immunoprecipitation assay of neurons from the hippocampus, which were cultured for 4 days either in the presence of (+) or in the absence of (-) lovastatin/mevalonate. Cyclodextrin was added for 0 or 5 or 20 min (0, 20, 5). b shows a similar immunoprecipitation assay to a, where in this case CD cholesterol was added for the indicated time in minutes (0 or 15). c shows the relative $A\beta$ secretion in cells to which the cholesterol was either removed by

means of lovastatin and cyclodextrin or added, compared to untreated control cells (average of 3-11 experiments). The figures next to cyclodextrin and CD cholesterol give the time of addition in minutes.

Figure 3 shows that the removal of cholesterol reduces the accumulation of APP in DIGs. Neurons were extracted in accordance with Example 2 and centrifuged through an OptiPrep gradient, after which larger molecules and complexes ($A\beta$ -DIG) are found more at the upper end of the test tube (top) and uncomplexed, smaller molecules ($A\beta$) migrate downward (bottom). - depletion or + depletion refers to the cholesterol that, as described above, was removed (+) or not removed (-).

This invention is illustrated in more detail by the following examples, where the data concerning amounts and other details are exemplary and not to be understood as exhaustive.

Examples

Example 1

Primary cell cultures of neurons from rat hippocampus were plated and cultured by traditional methods (minimum essential medium (MEM) with 10% horse serum, 5% CO_2 , 36.5°C). The addition of 5 mM cytosine arabinose prevented the multiplication of non-neuronal cells. After 5-7 days 4 μ M lovastatin and 0.25 mM mevalonate were added for 4 days.

The neurons were then infected for 1 h at 37°C and 5% CO_2 with recombinant SFV, which codes for the human APP 695 protein, as is already known from the prior art. The cells were incubated for 2 h in lovastatin/mevalonate and then incubated for 5-20 min with 5 mM methyl- β -cyclodextrin (Sigma) in a methionine-free labeling medium (MEM with 1/10 N_2 addition). The cells were labeled with 150 μ Ci [^{35}S]-methionine for 2.5 h. Lovastatin in the presence of small amounts of mevalonate inhibits cholesterol biosynthesis. Methyl- β -cyclodextrin removes in particular cellular cholesterol.

After the metabolic labeling the culture medium was collected and cell extracts prepared (2% NP-40, 0.2% SDS, 5 mM EDTA, with protease inhibitors as additive). The immunoprecipitates were recovered on A Sepharose (Boehringer) and analyzed on 10-20% tris-tricine polyacrylamide gels (Novex). The radioactivity was determined by means of a phosphorus imager (Molecular Dynamics). The antibodies that were used were Fd-APP against APP 695, B12/4 against the 20C terminal amino acids of APP, and B7/6 against the amino acids 1-16 of the synthetic human $A\beta$ peptide 1-40. Figure 2 shows the results of this immunoprecipitation assay. In a cells were analyzed that had been cultured with or without lovastatin ("- or "+") and with cyclodextrin for 0, 20 or 5 min. The visible bands correspond to $A\beta$. Here it clearly turns out that the secretion of $A\beta$ can be reduced through the removal of

cholesterol, which is brought about through the addition of lovastatin and cyclodextrin. Cholesterol was readded to some cells (CD cholesterol).

b shows a similar immunoprecipitation assay in which, however, cholesterol was again added to the cells that are represented in the two right-hand tracks. The A β bands are also visible there.

The diagram c shows the relative A β secretion under different experimental conditions, which were already described above.

Example 2

Extracts of neuronal cells were prepared as in Example 1 except that they were pulse labeled for 20 min and then chased for 100 min in normal medium. Then the cells were extracted for 30 min on ice with 1% Triton X-100 in TEX (150 mM NaCl, 50 mM tris, pH 7.4, 2 mM EDTA, 2 mM DTT, 25 μ g/mL chymostatin, leupeptin, antipain, pepstatin A each). The extracts were then mixed with an equivalent amount of OptiPrep (Nycomed) and covered with a stepwise gradient of 30%, 25% and 3% OptiPrep in TEX. Then the 3 samples were centrifuged for 3 h at 4°C and 50,000 rpm, the fractions were collected and immunoprecipitated. The result is shown in Figure 3. Control cells in which cholesterol was not removed are represented under "- depletion," while the cells of "+ depletion" had been treated with lovastatin/cyclodextrin, in order to achieve a cholesterol depletion. "top" indicates the top portion of the test tube, while "bottom" indicates the bottom portion of the test tube. With this type of gradient complexes and larger molecules such as A β -DIG do not migrate to the bottom of the test tube, but are thus found more in the tracks that are marked with "top," while the A β molecules not associated with DIGs migrate downward. This experiment also clearly shows that the A β -DIG association is reduced in cells treated with cholesterol-lowering agents.

Claims

1. The use of cholesterol-lowering agents for prophylaxis or treatment of diseases that derive from a change of conformation of prions, and of Alzheimer's disease.
2. The use of cholesterol-lowering agents to affect signal transduction processes on the cell membrane.

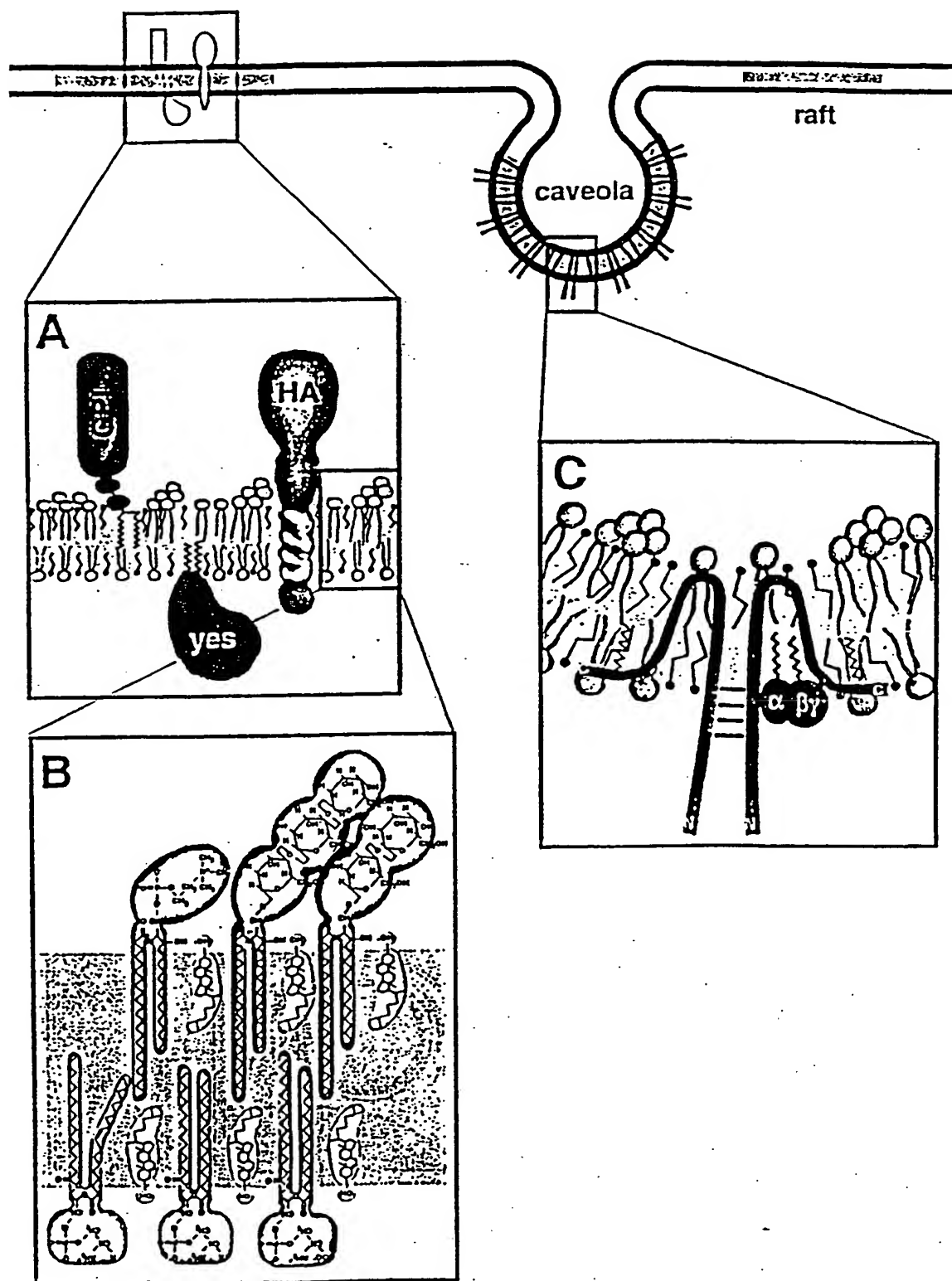


Figure 1

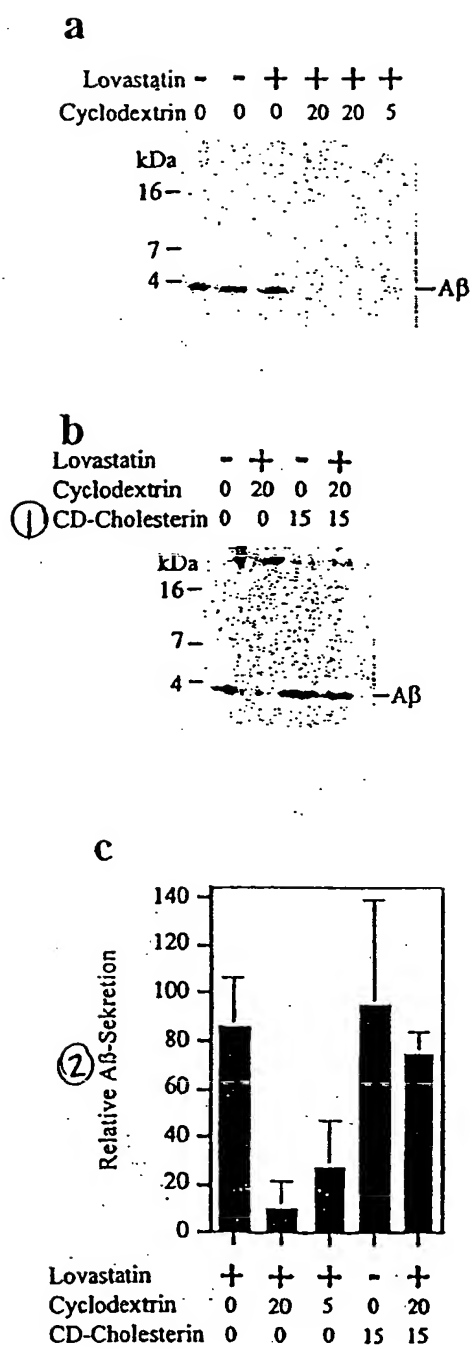


Figure 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 98/02284

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 A61K31/715

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	<p>KELLER AND SIMONS: "Cholesterol is Required for Surface Transport of Influenza Virus Hemagglutinin" THE JOURNAL OF CELL BIOLOGY, vol. 140, 23 March 1998, pages 1357-1367, XP002078575 see page 1358, left-hand column, paragraph 2 see page 1360, right-hand column see page 1364, left-hand column, paragraph 5 - right-hand column, paragraph 2; figures 7,8</p> <p style="text-align: center;">--- -/--</p>	1,2

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 September 1998

Date of mailing of the international search report

07/10/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Kanbier, D

Key: 1 CD cholesterol
2 Relative A β secretion

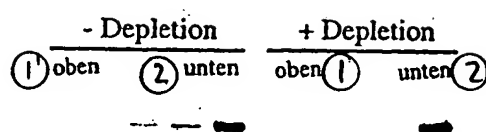


Figure 3

Key: 1 Top
2 Bottom

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 98/02284

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BANDIERA ET AL: "Inhibitors of A-Beta Peptide Aggregation as Potential Anti-Alzheimer Agents" CURRENT MEDICINAL CHEMISTRY, vol. 4/3, 1997, pages 159-170, XP002078579 see page 159 see page 160, right-hand column - page 161, left-hand column see page 166	1
X	WO 95 06470 A (MERCK & CO INC) 9 March 1995 see page 1, column 5-13; claims 1-4,6-10	1
X	WO 96 19987 A (JANSSEN PHARMACEUTICA NV) 4 July 1996 see page 4, column 23-30 see page 7, column 31-35 see page 8, line 37 - page 9, line 4 see page 9, line 19-24; claims 1,2,10	1
X	WO 94 02518 A (UNIV KANSAS) 3 February 1994 see page 19, paragraph 3 see page 3, paragraph 4 - page 5, paragraph 1; claims 1,30 see page 8, paragraph 4	2
X	DATABASE WPI Week 7532 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 75-53053w XP002078580 & JP 50 035315 A (NIPPON KAYAKU KK) , 4 April 1975 see abstract & JP 50 035315 A (NIPPON KAYAKU KK) 4 April 1975	2
A	WO 96 20184 A (PFIZER) 4 July 1996 see page 1, line 20-29 see page 32, line 25 - page 33, column 9 see page 34, line 13-20	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 98/02284

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	TARABOULOS ET AL: "Cholesterol Depletion and Modification of COOH-Terminal Sequence of the Prion Protein Inhibit Formation of the Scrapie Isoform" THE JOURNAL OF CELL BIOLOGY, vol. 129, 1995, pages 121-132, XP002078576 see page 126 see page 129, left-hand column see page 130 see page 122	1,2
X Y	WO 94 04556 A (UNIV NEW YORK) 3 March 1994 see page 1, column 14-33 see page 3, line 11-15 see page 4, line 26-30 see page 10, line 37 - page 11, line 16; claims 7-11 see page 13, line 35 - page 14, line 30; claims 13,17-19 see page 15, line 24-30 see page 19, line 15-28	2 2
X Y	US 5 569 452 A (TSRL INC.) 29 October 1996 see column 1, line 50-57; claims 1,5,7 see column 3, line 37-63	2 2
X	STANKEWICH ET AL: "Alterations in Cell Cholesterol Content Modulate Ca ² -Induced Tight Junction Assembly by MDCK Cells" LIPIDS, vol. 31, no. 8, 1996, pages 817-828, XP002078577 see page 819, right-hand column; figures 1A,1C see page 820; figure 5; table 4 see page 825, left-hand column see page 826, right-hand column, line 3-5	2
X	CAMILLERI ET AL: "Beta-Cyclodextrin Interacts with the Alzheimer Amyloid Beta-A4 Peptide" FEBS LETTERS, vol. 341, 1994, pages 256-258, XP002078578 see page 256 see page 258, right-hand column, paragraph 2	1

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

Inter national Application No

PCT/EP 98/02284

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9404556 A	03-03-1994	AU 5081593 A CN 1087091 A	15-03-1994 25-05-1994
US 5569452 A	29-10-1996	NONE	
WO 9506470 A	09-03-1995	AU 7397094 A US 5368404 A	22-03-1995 29-11-1994
WO 9619987 A	04-07-1996	AU 4347796 A CA 2207333 A CN 1171739 A EP 0801564 A FI 972793 A NO 972980 A	19-07-1996 04-07-1996 28-01-1998 22-10-1997 27-06-1997 26-06-1997
WO 9402518 A	03-02-1994	US 5376645 A AU 672814 B AU 4779993 A CA 2119154 A EP 0620828 A JP 6511513 T	27-12-1994 17-10-1996 14-02-1994 03-02-1994 26-10-1994 22-12-1994
WO 9620184 A	04-07-1996	AU 4067795 A BG 100248 A BR 9505995 A CA 2207772 A CN 1133287 A CZ 9503447 A FI 972696 A HU 74672 A JP 10500702 T LV 11325 A LV 11325 B NO 955288 A PL 311997 A SI 9500393 A SK 158795 A US 5770594 A	04-07-1996 31-07-1996 23-12-1997 04-07-1996 16-10-1996 11-09-1996 23-06-1997 28-01-1997 20-01-1998 20-06-1996 20-02-1997 24-06-1996 24-06-1996 30-04-1997 08-01-1997 23-06-1998

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 98/ 02284

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Observation: Although Claim(s) 1-2 relate to a method for treatment of the human/animal body, the search was carried out and was based on the cited effects of the compound/composition.

2. ☒ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

See Supplemental Sheet ADDITIONAL MATTER PCT/ISA/210

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : A61K 31/715	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/47518 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 29. Oktober 1998 (29.10.98)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/02284 (22) Internationales Anmeldedatum: 17. April 1998 (17.04.98) (30) Prioritätsdaten: 197 16 120.0 17. April 1997 (17.04.97) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): EUROPAISCHES LABORATORIUM FÜR MOLEKULAR-BIOLOGIE (EMBL) [DE/DE]; Meyerhofstrasse 1, D-69117 Heidelberg (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SIMONS, Kai [FI/DE]; Kleinschmidtstrasse 27, D-69115 Heidelberg (DE). (74) Anwälte: WEICKMANN, H. usw.; Kopernikusstrasse 9, D-81679 München (DE).	(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
(54) Title: USE OF CHOLESTEROL-LOWERING AGENTS TO INFLUENCE SIGNAL TRANSDUCTION PROCESSES IN THE CELL MEMBRANE AND IN THE PROPHYLAXIS OR TREATMENT OF PRION-ASSOCIATED DISEASES OR ALZHEIMER'S DISEASE (54) Bezeichnung: VERWENDUNG VON CHOLESTERINSENKENDEN MITTELN ZUR BEEINFLUSSUNG VON SIGNALTRANSDUKTIONSVORGÄNGEN AN DER ZELLMEMBRAN, IN DIE PROPHYLAXE ODER BEHANDLUNG VON PRION-ASSORZIERTE- ODER ALZHEIMERISCHE KRANKHEIT (57) Abstract The invention relates to the use of cholesterol-lowering agents in the prophylaxis or treatment of diseases based on conformational change of prions and Alzheimer's disease as well as for influencing signal transduction processes in the cell membrane. (57) Zusammenfassung Zur Prophylaxe oder Behandlung von Krankheiten, die auf einer Konformationsänderung von Prionen beruhen, und von Alzheimer'scher Krankheit werden im Rahmen der Erfindung cholesterinsenkende Mittel ebenso eingesetzt wie zur Beeinflussung von Signaltransduktionsvorgängen an der Zellmembran.		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

VERWENDUNG VON CHOLESTERINSENKENDEN MITTELN ZUR BEEINFLUSSUNG VON SIGNALTRANS-
DUKTIONSVORGÄNGEN AN DER ZELLMEMBRAN, IN DIE PROPHYLAXE ODER BEHANDLUNG VON
PRION-ASSORZIERTE- ODER ALZHEIMERISCHE KRANKHEIT

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von cholesterinsenkenden
5 Mitteln zur Prophylaxe oder Behandlung von Erkrankungen, die mit einer
Konformationsänderung von Prionen einhergehen, oder von Alzheimer'scher
Krankheit.

Für die meisten Molekularbiologen, die sich mit Membranproteinen beschäftigen,
10 liegt die Funktion von Lipiden hauptsächlich in ihrer Eigenschaft, als Solvens für
Proteine zu dienen (Singer & Nicolson, Science 175 (1972), 720-731). Dies ist
jedoch sicher nicht ihre einzige Rolle. Die verschiedenen Lipidarten sind nicht nur
in einer fluiden Doppelschicht angeordnet, sondern sie sind auch über die
exoplasmatischen und cytoplasmatischen Membranbereiche asymmetrisch verteilt
15 (Bretscher und Raff, Nature 258 (1975), 43-49; Roelofsen & Op den Kamp,
Plasma Membrane Phospholipid Asymmetry and its Maintenance: The Human
Erythrocyte as a Model 1-7-46 (1994)). Außerdem hat man festgestellt, dass die
Lipide auch in bestimmter Weise organisiert sind und damit mehr
Regulierungsaufgaben erfüllen als bisher bekannt (Glaser, Curr. Op. Struct. Biol.
20 3 (1993), 475-481, Thomas et al., J. Cell Biol. 125 (1994), 195-802, Kusumi
& Sako, Curr. Opin. Cell Bio. 8 (1996), 566-574). Es hat sich nun gezeigt, dass
eine laterale Organisation von Lipiden entsteht durch Verbindung von
Sphingolipiden und Cholesterin zu sich bewegenden Schollen oder Flößen, an
welche sich Proteine innerhalb der Doppelschicht spezifisch anlagern können. Die
25 Existenz solcher Sphingolipid-Cholesterin-Flöße führt zu einer grundsätzlich
anderen Beurteilung der Membranorganisation und erlaubt neue Einblicke in die
Funktion von Zellmembranen.

Auf Basis von Untersuchungen zu solchen Sphingolipid-Cholesterin-Flößen sind
30 die in Figur 1B gezeigten Modelle entstanden. Man geht davon aus, dass die
Sphingolipidkopfgruppen, welche größere Bereiche der Ebene des
exoplasmatischen Teils der Membran belegen als die Kohlenwasserstoffketten der

- 2 -

Lipide in der Membranschicht, Zwischenräume entstehen lassen, die durch Cholesterinmoleküle gefüllt werden, die sozusagen als Abstandhalter fungieren (Figur 1B). Eine dichte Aneinanderfügung dieser Sphingolipid-Cholesterinklaster auf dem exoplasmatischen Teil der Membran lässt sie als Gesamtanordnung innerhalb der Membrandoppelschicht fungieren. Es ist dabei wichtig, festzustellen, dass die Sphingolipide normalerweise eine lange Fettsäure (C_{20} - C_{26}) aufweisen, die über eine Amidbindung an die Sphingosinbasis angeheftet ist, wobei aufgrund der Länge der Fettsäure diese mit dem cytoplasmatischen Teil der Doppelschicht der Membran in Verbindung treten kann. Da Cholesterin in beiden Membranschichten vorhanden ist, ist es auch möglich, dass das Molekül als Spacer im cytoplasmatischen Teil der Membran fungiert und dabei Zwischenräume ausfüllt zwischen dort vorhandenen Fettsäuren (Figur 1B). Die neuen Erkenntnisse über die Organisation von Sphingolipiden und Cholesterin in der Zellmembran führten nun zu der Erkenntnis, dass hierin auch eine Grundlage liegen könnte für die Behandlung oder Verhinderung von Krankheiten, welche mit einer Konformationsänderung von Prionproteinen einhergehen, oder aber der Alzheimer'schen Krankheit. Derartige Krankheiten sind bisher noch nicht behandelbar, meist ist auch ihre Erkennung sehr schwierig, eine letztendliche Sicherheit kann meist nur durch Autopsie nach dem Tode des Patienten erhalten werden. Insofern besteht ein dringendes Bedürfnis an einer Möglichkeit, derartige Krankheiten, zumindest im Verdachtsfall, zu behandeln oder ihre Entstehung zu verhindern.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es daher, eine Möglichkeit bereitzustellen, auf Krankheiten wie die Alzheimer'sche Krankheit oder andere Krankheiten, bei welchen eine Veränderung von Proteinen an Sphingolipid-Cholesterin-Flößen stattfindet, positiv einwirken zu können.

Gelöst wird diese Aufgabe erfindungsgemäß durch die Verwendung von cholesterinsenkenden Mitteln zur Prophylaxe oder Behandlung von Erkrankungen, die auf einer Konformationsänderung von Prionen beruhen, oder von Alzheimer'scher Krankheit. Als cholesterinsenkende Mittel können alle Mittel

- 3 -

verwendet werden, welche den Cholesteringehalt im Blut senken und zu diesem Zweck zur Prophylaxe anderer Erkrankungen, vor allem der Arteriosklerose und des Herzinfarkts eingesetzt werden oder werden können. Beispiele von cholesterinsenkenden Mitteln umfassen den Wirkstoff Lovastatin (Mevinacor, 5 Mevinolin, Monacolin-K, MK-803), sowie weitere Arzneimittel gegen Hypercholesterinämie, wie etwa Pravastatin-Natrium, Simvastatin, Bezafibrat, Clofibrat, Etofyllinclofibrat, Xenofibrat, Gemfibrozyl, Etofibrat, Colestipol-HCl, Colestyramin, Xantinolnicotinat, Icositolnicotinat, Probucol und dergleichen. Lovastatin hemmt die Cholesterinbiosynthese auf der Basis der Mevalonsäure. Es 10 wird bereits als Arzneimittel bei Hypercholesterinämie verwendet, wo es in Dosen von bis zu 20 mg/Tag verabreicht wird. Die erfindungsgemäßen Dosierungen von cholesterinsenkenden Mitteln sind bekannt oder können vom Fachmann leicht ermittelt werden.

15 Eine weitere mögliche Art und Weise zur Senkung des Cholesteringehalts ist, auf die Regulierung des Cholesterinmetabolismus Einfluß zu nehmen. Die Verteilung von Cholesterin auf Sphingolipid-Cholesterinflöße ist viel höher als dessen Verteilung auf Gebiete, in denen sich keine Flöße befinden. Im endoplasmatischen Retikulum, wo der zelluläre Cholesteringehalt wahrgenommen und reguliert wird, 20 gibt es praktisch keine Flöße. Sphingolipid-Cholesterinflöße fließen vom Golgi-Apparat nicht zum endoplasmatischen Retikulum zurück. Das Senken des Cholesteringehalts beeinflusst zunächst das nicht in Flößen enthaltene Cholesterin, was dazu führt, daß weniger Cholesterin in das endoplasmatische Retikulum zurückfließt. Indem beispielsweise der Sphingolipidgehalt reduziert 25 wird, wäre es dann möglich, gleichzeitig die Cholesterinsynthese in der Zelle zu senken, da mehr Cholesterin in das endoplasmatische Retikulum zurückfließen kann. Dies kann beispielsweise durch Sphingolipidsynthese-Inhibitoren geschehen.

30 Als Krankheiten, die auf einer Konformationsänderung von Prionproteinen beruhen, wird derzeit vor allem die beim Schaf auftretende Krankheit Scrapie angesehen. Auch für die BSE-Problematik könnte die vorliegende Erfindung von

- 4 -

Bedeutung sein, wenn sich erhärtet, dass der auslösende Faktor für die letztendlich zum Tode führende Krankheit ebenfalls die Konformationsänderung von Prionproteinen ist und diese Erkrankung der Rinder auf den Menschen übertragbar ist. Somit wäre auch die Behandlung der Creutzfeld-Jacob-Krankheit
5 ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

Das Scrapie-Prionenprotein PrP^{sc} ist die bisher einzige bekannte Komponente eines übertragbaren Prions. Es ist abgeleitet von einem normalerweise an Glycosylphosphatidylinositol (GPI) verankerten Protein PrP^{c} , das in Neuronen
10 exprimiert wird, wobei durch eine Konformationsänderung des PrP^{c} das Prionprotein PrP^{sc} entsteht, welches proteaseresistent ist. Vermutlich findet diese Konformationsänderung an Sphingolipid-Cholesterin-Flößen statt. Die Konformationsänderung scheint abhängig zu sein von der GPI-Verankerung, da chimäre Proteine, die eine eigene Transmembrandomäne enthalten, nicht der
15 Konformationsänderung unterliegen. PrP^{c} ist unlöslich in Triton X-100 bei 4°C während der Konformationsänderung, und eine Verarmung an zellulärem Cholesterin verhindert die Bildung von PrP^{sc} . Interessanterweise kann PrP^{c} durch clathrinbeschichtete Vesikel mittels Endocytose in die Zelle eingeschleust werden, vermutlich aufgrund von Bindung an ein bisher unbekanntes
20 Transmembranprotein mit einem sogenannten coated pit-Signal. Diese Bindung hält PrP^{c} möglicherweise von den Flößen entfernt, wo die bisher noch ungeklärte PrP^{c} - PrP^{sc} -Transformation stattzufinden scheint.

Eines der wichtigen Merkmale der Pathogenese der Alzheimer'schen Krankheit
25 ist die fortschreitende zerebrale Anhäufung des Amyloid- β -Peptids ($A\beta$), einem proteolytischen Spaltprodukt aus einem Amyloidvorläuferprotein (APP). Neu synthetisiertes APP wird in den Neuronen in die Axone geleitet und dann durch Transzytose an die Dendriten weitergeführt. APP wird während des intrazellulären Transports einer Reihe von Spaltungen unterzogen, wobei entweder das amyloide
30 Fragment $A\beta$ oder eine nicht amyloide, sekretierte Form APP_{sec} (secreted) freigesetzt wird. Bei der Spaltung zu APP_{sec} durch α -Sekretase (α -Spaltung) verbleibt ein Transmembranfragment von 8 kDa in der Zellmembran. Die Spaltung

von APP zu A β geschieht in zwei Schritten. Zunächst wird durch die sog. β -Spaltung ein Fragment von 10 kDa von APP erzeugt, welches dann innerhalb der Transmembrandomäne noch einmal gespalten wird (γ -Spaltung), wobei A β entsteht. Wie PrP^c ist auch ein Teil des APP in Neuronen in Triton X-100 unlöslich, eine Eigenschaft, die auch GPI-verankerte und Transmembranproteine aufweisen, welche an Sphingolipid-Flöße binden. Wo genau die A β -Produktion stattfindet, ist nicht klar, jedoch weisen kürzlich erhaltene Resultate darauf hin, dass A β komplexiert an ein Lipid in Sphingolipid-Cholesterin-Flößen, das GM1-Gangliosid, vorgefunden wird in den frühesten Krankheitsmanifestationen im Gehirn. Interessanterweise wird ein kleiner Teil APP auch in detergensunlöslichen, glycolipidangereicherten Komplexen, sogenannten DIGs (Brown & Rose, J. Cell 68 (1992), 533-544; Parton & Simons, Science 269 (1995), 1398-1399) aufgefunden. Möglicherweise wird APP durch die Bindung an GM1 an die Flöße fixiert und die Proteolyse könnte möglicherweise in den Sphingolipid-Cholesterin-Mikrodomänen stattfinden, wobei A β entsteht, das an GM1 gebunden ist. Das A β -Peptid ist im APP-Molekül genau dort lokalisiert, wo es auch zu erwarten ist, wenn man davon ausgeht, dass diese Region an ein Glycosphingolipid bindet. Eine weitere interessante Verbindung zu den Sphingolipid-Cholesterin-Flößen ist die kürzlich erhaltene Erkenntnis, dass A β an den Rezeptor für Glycanisierungsendprodukte bindet (Yan et al., Nature 382 (1996), 685-691), von denen festgestellt wurde, dass sie mit DIGs und Caveolen in Endothelzellen assoziieren (Lisanti et al., Developm. Biol. 6 (1995), 47-58).

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurde festgestellt, dass die Verwendung cholesterinsenkender Mittel einen positiven Effekt auf die obengenannten Krankheiten ausübt. Dies beruht möglicherweise auf einer Verringerung der Zahl der Flöße in den Plasmamembranen und damit einer Verringerung der Anzahl an möglichen Ankerpunkten, an denen dann eine Konformationsänderung von Proteinen stattfindet.

30

Die erfindungsgemäße Erkenntnis, dass cholesterinsenkende Mittel sich positiv auf die Alzheimer'sche Krankheit oder Krankheiten, wie z.B. Creutzfeld-Jacob-

- 6 -

Krankheit, auswirkt, lässt erstmals eine Behandlungsmöglichkeit entstehen, die an der Ursache der Krankheit angreift.

Des Weiteren erscheint - durch die erfindungsgemäße Verwendung
5 cholesterinsenkender Mittel auch allgemein eine Einflussnahme auf
Signaltransduktionsvorgänge von außen in Zellen möglich. Kürzlich konnte
gezeigt werden, dass zahlreiche Proteine, die in Sphingolipid-Cholesterin-Flößen
enthalten sind, in der Signaltransduktion eine wichtige Rolle spielen (Parton &
Simons, Science 269 (1995), 1398-1399; Anderson, Proc. Natl. Acad. Sci. USA
10 90 (1993), 10909-10913; Lisanti et al., Trends Cell Biol. 4 (1994), 231-235).

Durch die Entstehung von Sphingolipid-Cholesterin-Flößen wird auf der
Zellmembran eine Subkompartimentierung bewirkt, die dazu führt, dass
unterschiedliche Strukturen entstehen, also Flöße verschiedener Größe, und
15 Zwischenräume ohne Floßstruktur.

Ohne Cholesterin ist die Floßbildung nicht möglich und insofern sind also viele
Signaltransduktionsvorgänge abhängig von der Anwesenheit von Cholesterin.
Beispielhaft für solche Vorgänge können genannt werden: Signaltransduktion
20 über Heterotrimere G Proteine (Li et al., J. Biol. Chem. 270 (1995), 15693-
15701), Ras (Song et al., J. Biol. Chem. 271 (1996), 9690-9697; Mineo et al.,
J. Biol. Chem. 271 (1996), 11930-11935) und Ceramide (Liu & Anderson, J.
Biol. Chem. 270 (1995), 27179-27185). Beispiele für
Signaltransduktionsprozesse, in denen Flöße als Plattformen eine Rolle spielen,
25 sind Immunoglobulin-E-Signalprozesse in allergischen Reaktionen, T-Zell-Rezeptor-
Signalprozesse, LPS-Endotoxin-Signalprozesse, Signalprozesse der endothelischen
NO-Synthase, Signalprozesse durch Tyrosinkinasen, wie etwa Lyn und Fyn,
welche doppelt acyliert sind und über trimerische G-Proteine, die doppelt acylierte
Untereinheiten enthalten, sowie über GPI-verankerte Proteine Signale übertragen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher die Verwendung cholesterinsenkender Mittel zur Beeinflussung von Signaltransduktionsvorgängen an der Zellmembran.

5 Figurenbeschreibung

Fig. 1 zeigt eine Zellmembran im Querschnitt. A zeigt einen Ausschnitt mit Flößen, die mittels ihrer GPI-Anker an die exoplasmatische Schicht der Membran gebundene Proteine enthalten. B zeigt eine Vergrößerung eines Sphingolipid-Cholesterin-Floßes.

Fig. 2 zeigt, dass das Entfernen von Cholesterin die Produktion und die Sekretion von $A\beta$ hemmt. a zeigt einen Immunopräzipitations-Assay von Neuronen aus dem Hippokampus, welche für 4 Tage entweder in Gegenwart von (+) oder in Abwesenheit von (-) Lovastatin/Mevalonat kultiviert wurden. Cyclodextrin wurde für 0 bzw. 5 bzw. 20 Min zugegeben (0, 20, 5). b zeigt einen ähnlichen Immunopräzipitations-Assay wie a, wobei hier CD-Cholesterin für die angegebene Zeit in Min (0 bzw. 15) hinzugegeben wurde. c zeigt die relative $A\beta$ -Sekretion in Zellen, in denen das Cholesterin durch Lovastatin und Cyclodextrin entfernt bzw. wieder hinzugegeben wurde, im Vergleich mit unbehandelten Kontrollzellen (Mittel aus 3-11 Experimenten). Die Ziffern neben Cyclodextrin und CD-Cholesterin geben die Zeit der Zugabe in Minuten an.

Fig. 3 zeigt, dass das Entfernen von Cholesterin die Anlagerung von APP an DIGs reduziert. Neuronen wurden gemäß Beispiel 2 extrahiert und durch einen OptiPrep-Gradienten zentrifugiert, wonach größere Moleküle und Komplexe ($A\beta$ -DIG) sich mehr am oberen Ende des Teströhrchens befinden (oben) und nicht komplexierte, kleinere Moleküle ($A\beta$) nach unten wandern (unten). - Depletion bzw. +

- 8 -

Depletion beziehen sich auf das Cholesterin, das, wie oben beschrieben, entfernt wurde (+) oder nicht entfernt wurde (-).

Die vorliegende Erfindung wird durch die folgenden Beispiele näher erläutert, wobei die Mengenangaben und andere Einzelheiten beispielhaft und nicht erschöpfend zu verstehen sind.

Beispiele

10 Beispiel 1

Primäre Zellkulturen von Neuronen aus dem Hippokampus der Ratte wurden plattiert und nach herkömmlichen Verfahren kultiviert (minimales essentielles Medium (MEM) mit 10% Pferdeserum, 5% CO₂, 36,5°C). Die Zugabe von 5 mM Cytosinarabinose verhinderte die Vermehrung von nicht neuronalen Zellen. Nach 15 5-7 Tagen wurden 4 µM Lovastatin und 0,25 mM Mevalonat für 4 Tage hinzugegeben.

Die Neuronen wurden dann für 1 Std bei 37°C und 5% CO₂ mit rekombinantem SFV infiziert, welcher für das menschliche APP 695-Protein kodiert, wie bereits 20 aus dem Stand der Technik bekannt. Die Zellen wurden für 2 Std in Lovastatin/Mevalonat inkubiert und anschließend für 5-20 Min mit 5 mM Methyl-β-Cyclodextrin (Sigma) in einem Methionin-freien Markierungsmedium inkubiert (MEM mit 1/10 N2-Zusatz). Die Zellen wurden für 2,5 Std mit 150 µCi [³⁵S]-Methionin markiert. Lovastatin hemmt bei Vorhandensein von geringen Mengen 25 Mevalonat die Cholesterinbiosynthese. Methyl-β-Cyclodextrin entfernt speziell zelluläres Cholesterin.

Nach der metabolischen Markierung wurde das Kulturmedium gesammelt und 30 Zellextrakte hergestellt (2% NP-40, 0,2% SDS, 5 mM EDTA, mit Proteaseinhibitoren als Zusatz). Die Immunopräzipitate wurden auf A-Sepharose (Boehringer) rückgewonnen und auf 10-20%-igen Tris-Tricin-Polyacrylamidgelen

- analysiert (Novex). Die Radioaktivität wurde anhand eines Phosphorlmagers (Molecular Dynamics) bestimmt. Die verwendeten Antikörper waren Fd-APP gegen APP 695, B12/4 gegen die 20C-terminalen Aminosäuren von APP und B7/6 gegen die Aminosäuren 1-16 des synthetischen humanen A β -Peptids 1-40.
- 5 Fig.2 zeigt die Ergebnisse solcher Immunopräzipitations-Assays. In a wurden Zellen analysiert, die mit oder ohne Lovastatin kultiviert worden waren ("-" bzw. "+") sowie mit Cyclodextrin für 0 bzw. 20 bzw. 5 Min. Die sichtbaren Banden entsprechen A β . Hierdurch wird deutlich gezeigt, dass die Sekretion von A β durch das Entfernen von Cholesterin, was durch die Zugabe von Lovastatin und
- 10 Cyclodextrin bewirkt wird, reduziert werden kann. Zu einigen Zellen wurde Cholesterin wieder hinzugegeben (CD-Cholesterin).
- b zeigt einen ähnlichen Immunopräzipitations-Assay, bei dem jedoch zu den Zellen, die in den beiden rechten Bahnen dargestellt sind, Cholesterin wieder hinzugegeben wurde. Dort sind auch die A β -Banden sichtbar.
- 15 Das Diagramm c zeigt die relative A β -Sekretion unter verschiedenen experimentellen Bedingungen, die oben bereits beschrieben wurden.

Beispiel 2

- 20 Extrakte von neuronalen Zellen wurden wie in Beispiel 1 hergestellt, bis auf die Tatsache, dass sie für 20 Min pulsmarkiert wurden und dann für 100 Min in normalem Medium gechased wurden. Anschließend wurden die Zellen für 30 Min auf Eis mit 1% Triton X-100 in TEX (150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 7,4, 2 mM EDTA, 2 mM DTT, 25 μ g/ml jeweils von Chymostatin, Leupeptin, Antipain,
- 25 Pepstatin A) extrahiert. Die Extrakte wurden dann mit einer äquivalenten Menge OptiPrep (Nycomed) vermischt und mit einem schrittweisen Gradienten von 30%, 25% und 3% OptiPrep in TEX überlagert. Danach wurden die Proben 3 Std bei 4°C und 50,000 U/Min zentrifugiert, die Fraktionen wurden gesammelt und immunopräzipitiert. Das Ergebnis ist in Fig.3 dargestellt. Unter "- Depletion" sind
- 30 Kontrollzellen dargestellt, in denen Cholesterin nicht entfernt wurde, während die Zellen von "+ Depletion" mit Lovastatin/Cyclodextrin behandelt worden waren, um Cholesterin-Depletion zu erzielen. "oben" bezeichnet den oberen Teil des

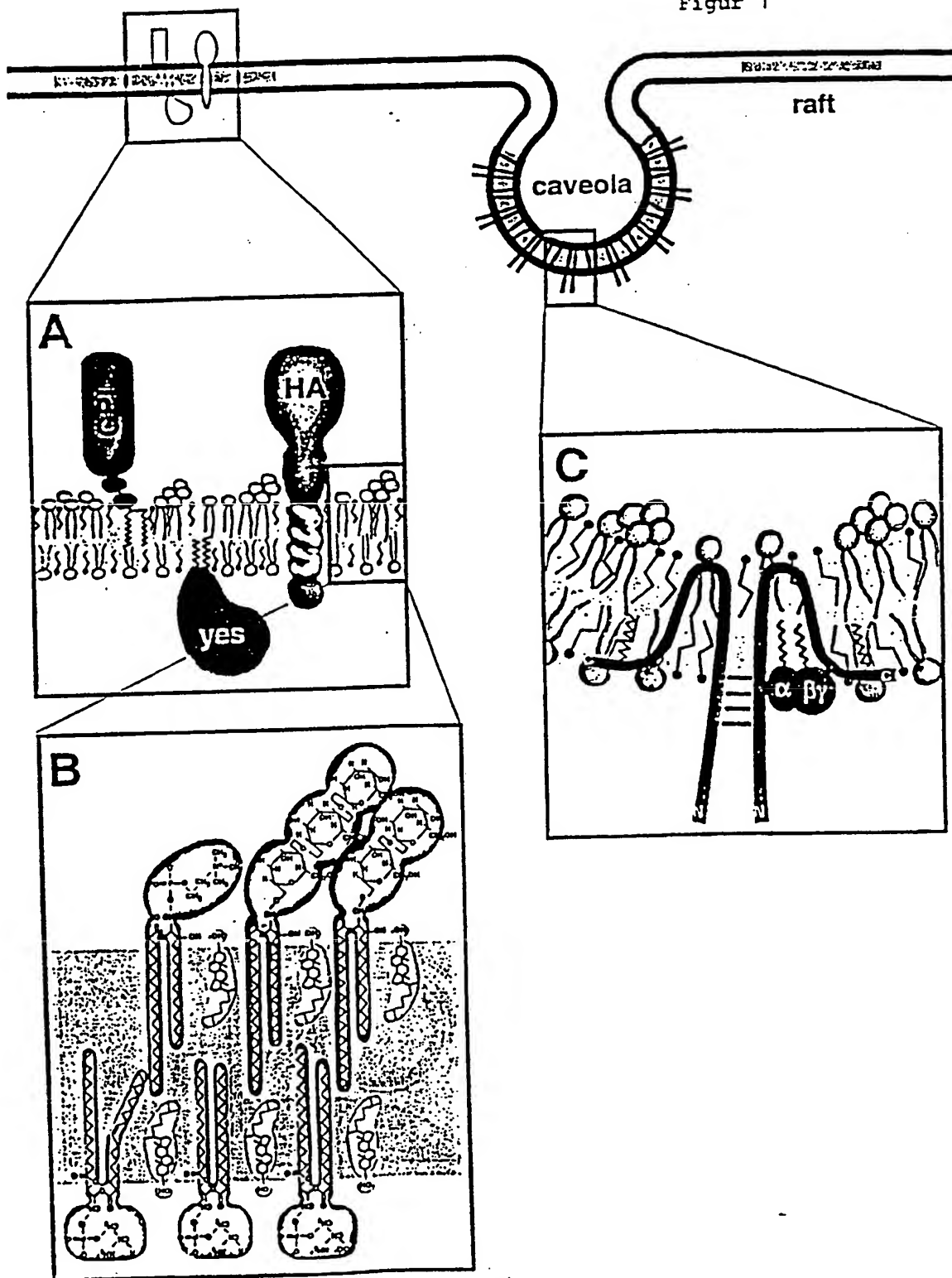
- 10 -

Teströhrchens, "unten" bezeichnet den unteren Teil des Teströhrchens. Bei dieser Art von Gradient wandern Komplexe und größere Moleküle, wie etwa A β -DIG nicht bis zum Boden des Röhrchens, finden sich also mehr in den Bahnen, die mit "oben" überschrieben sind, während die nicht mit DIGs assoziierten A β -Moleküle
5 nach unten wandern. Dieses Experiment zeigt also deutlich, dass in Zellen, die mit cholesterindepletierenden Mitteln behandelt worden waren, eine A β -DIG-Assoziierung reduziert wird.

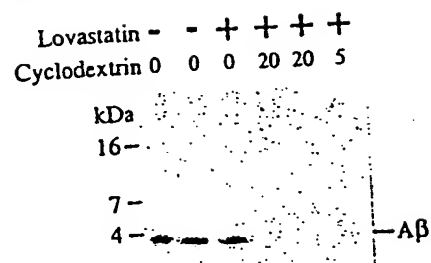
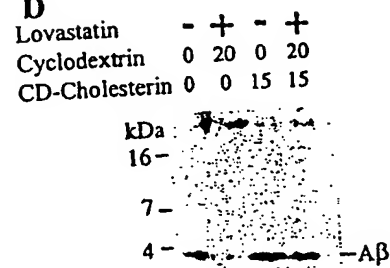
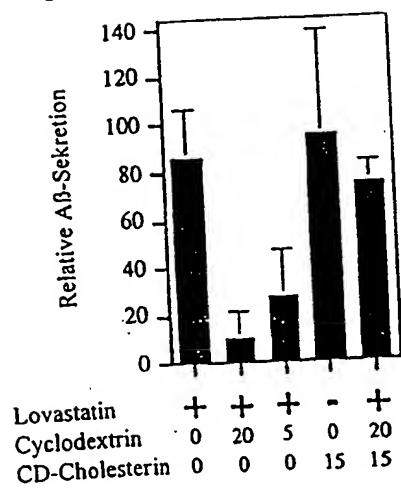
Ansprüche

1. Verwendung von cholesterinsenkenden Mitteln zur Prophylaxe oder
5 Behandlung von Erkrankungen, die auf einer Konformationsänderung von
Prionen beruhen, und von Alzheimer'scher Krankheit.
2. Verwendung von cholesterinsenkenden Mitteln zur Beeinflussung von
Signaltransduktionsvorgängen an der Zellmembran.

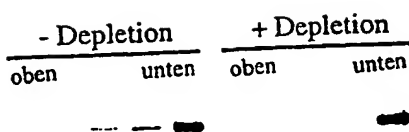
Figur 1



FIGUR 2

a**b****c**

FIGUR 3



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 98/02284

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 A61K31/715

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	<p>KELLER AND SIMONS: "Cholesterol is Required for Surface Transport of Influenza Virus Hemagglutinin" THE JOURNAL OF CELL BIOLOGY, vol. 140, 23 March 1998, pages 1357-1367, XP002078575</p> <p>see page 1358, left-hand column, paragraph 2</p> <p>see page 1360, right-hand column</p> <p>see page 1364, left-hand column, paragraph 5 - right-hand column, paragraph 2; figures 7,8</p> <p style="text-align: center;">--- -/--</p>	1,2



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 September 1998

Date of mailing of the international search report

07/10/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Kanbier, D

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 98/02284

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	TARABOULOS ET AL: "Cholesterol Depletion and Modification of COOH-Terminal Sequence of the Prion Protein Inhibit Formation of the Scrapie Isoform" THE JOURNAL OF CELL BIOLOGY, vol. 129, 1995, pages 121-132, XP002078576 see page 126 see page 129, left-hand column see page 130 see page 122 ---	1,2
X Y	WO 94 04556 A (UNIV NEW YORK) 3 March 1994 see page 1, column 14-33 see page 3, line 11-15 see page 4, line 26-30 see page 10, line 37 - page 11, line 16; claims 7-11 see page 13, line 35 - page 14, line 30; claims 13,17-19 see page 15, line 24-30 see page 19, line 15-28 ---	2 2
X Y	US 5 569 452 A (TSRL INC.) 29 October 1996 see column 1, line 50-57; claims 1,5,7 see column 3, line 37-63 ---	2 2
X	STANKEWICH ET AL: "Alterations in Cell Cholesterol Content Modulate Ca ² -Induced Tight Junction Assembly by MDCK Cells" LIPIDS, vol. 31, no. 8, 1996, pages 817-828, XP002078577 see page 819, right-hand column; figures 1A,1C see page 820; figure 5; table 4 see page 825, left-hand column see page 826, right-hand column, line 3-5 ---	2
X	CAMILLERI ET AL: "Beta-Cyclodextrin Interacts with the Alzheimer Amyloid Beta-A4 Peptide" FEBS LETTERS, vol. 341, 1994, pages 256-258, XP002078578 see page 256 see page 258, right-hand column, paragraph 2 --- -/--	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 98/02284

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BANDIERA ET AL: "Inhibitors of A-Beta Peptide Aggregation as Potential Anti-Alzheimer Agents" CURRENT MEDICINAL CHEMISTRY, vol. 4/3, 1997, pages 159-170, XP002078579 see page 159 see page 160, right-hand column - page 161, left-hand column see page 166 ---	1
X	WO 95 06470 A (MERCK & CO INC) 9 March 1995 see page 1, column 5-13; claims 1-4,6-10 ---	1
X	WO 96 19987 A (JANSSEN PHARMACEUTICA NV) 4 July 1996 see page 4, column 23-30 see page 7, column 31-35 see page 8, line 37 - page 9, line 4 see page 9, line 19-24; claims 1,2,10 ---	1
X	WO 94 02518 A (UNIV KANSAS) 3 February 1994 see page 19, paragraph 3 see page 3, paragraph 4 - page 5, paragraph 1; claims 1,30 see page 8, paragraph 4 ---	2
X	DATABASE WPI Week 7532 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 75-53053w XP002078580 & JP 50 035315 A (NIPPON KAYAKU KK) , 4 April 1975 see abstract & JP 50 035315 A (NIPPON KAYAKU KK) 4 April 1975 ---	2
A	WO 96 20184 A (PFIZER) 4 July 1996 see page 1, line 20-29 see page 32, line 25 - page 33, column 9 see page 34, line 13-20 -----	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 98/ 02284

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Observation: Although Claim(s) 1-2 relate to a method for treatment of the human/animal body, the search was carried out and was based on the cited effects of the compound/composition.

2. ☒ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

See Supplemental Sheet ADDITIONAL MATTER PCT/ISA/210

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 98/02284

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9404556 A	03-03-1994	AU 5081593 A CN 1087091 A	15-03-1994 25-05-1994
US 5569452 A	29-10-1996	NONE	
WO 9506470 A	09-03-1995	AU 7397094 A US 5368404 A	22-03-1995 29-11-1994
WO 9619987 A	04-07-1996	AU 4347796 A CA 2207333 A CN 1171739 A EP 0801564 A FI 972793 A NO 972980 A	19-07-1996 04-07-1996 28-01-1998 22-10-1997 27-06-1997 26-06-1997
WO 9402518 A	03-02-1994	US 5376645 A AU 672814 B AU 4779993 A CA 2119154 A EP 0620828 A JP 6511513 T	27-12-1994 17-10-1996 14-02-1994 03-02-1994 26-10-1994 22-12-1994
WO 9620184 A	04-07-1996	AU 4067795 A BG 100248 A BR 9505995 A CA 2207772 A CN 1133287 A CZ 9503447 A FI 972696 A HU 74672 A JP 10500702 T LV 11325 A LV 11325 B NO 955288 A PL 311997 A SI 9500393 A SK 158795 A US 5770594 A	04-07-1996 31-07-1996 23-12-1997 04-07-1996 16-10-1996 11-09-1996 23-06-1997 28-01-1997 20-01-1998 20-06-1996 20-02-1997 24-06-1996 24-06-1996 30-04-1997 08-01-1997 23-06-1998

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/02284

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 A61K31/715

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P, X	<p>KELLER AND SIMONS: "Cholesterol is Required for Surface Transport of Influenza Virus Hemagglutinin" THE JOURNAL OF CELL BIOLOGY, Bd. 140, 23. März 1998, Seiten 1357-1367, XP002078575</p> <p>siehe Seite 1358, linke Spalte, Absatz 2 siehe Seite 1360, rechte Spalte siehe Seite 1364, linke Spalte, Absatz 5 - rechte Spalte, Absatz 2; Abbildungen 7,8</p> <p>---</p> <p>-/--</p>	1,2



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

24. September 1998

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

07/10/1998

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Beauftragter

Kanbier, D

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internales Aktenzeichen

PCT/EP 98/02284

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	TARABOULOS ET AL: "Cholesterol Depletion and Modification of COOH-Terminal Sequence of the Prion Protein Inhibit Formation of the Scrapie Isoform" THE JOURNAL OF CELL BIOLOGY, Bd. 129, 1995, Seiten 121-132, XP002078576 siehe Seite 126 siehe Seite 129, linke Spalte siehe Seite 130 siehe Seite 122	1,2
X	WO 94 04556 A (UNIV NEW YORK) 3. März 1994	2
Y	siehe Seite 1, Spalte 14-33 siehe Seite 3, Zeile 11-15 siehe Seite 4, Zeile 26-30 siehe Seite 10, Zeile 37 - Seite 11, Zeile 16; Ansprüche 7-11 siehe Seite 13, Zeile 35 - Seite 14, Zeile 30; Ansprüche 13,17-19 siehe Seite 15, Zeile 24-30 siehe Seite 19, Zeile 15-28	2
X	US 5 569 452 A (TSRL INC.) 29. Oktober 1996	2
Y	siehe Spalte 1, Zeile 50-57; Ansprüche 1,5,7 siehe Spalte 3, Zeile 37-63	2
X	STANKEWICH ET AL: "Alterations in Cell Cholesterol Content Modulate Ca ² -Induced Tight Junction Assembly by MDCK Cells" LIPIDS, Bd. 31, Nr. 8, 1996, Seiten 817-828, XP002078577 siehe Seite 819, rechte Spalte; Abbildungen 1A,1C siehe Seite 820; Abbildung 5; Tabelle 4 siehe Seite 825, linke Spalte siehe Seite 826, rechte Spalte, Zeile 3-5	2
X	CAMILLERI ET AL: "Beta-Cyclodextrin Interacts with the Alzheimer Amyloid Beta-A4 Peptide" FEBS LETTERS, Bd. 341, 1994, Seiten 256-258, XP002078578 siehe Seite 256 siehe Seite 258, rechte Spalte, Absatz 2	1

-/--

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	BANDIERA ET AL: "Inhibitors of A-Beta Peptide Aggregation as Potential Anti-Alzheimer Agents" CURRENT MEDICINAL CHEMISTRY, Bd. 4/3, 1997, Seiten 159-170, XP002078579 siehe Seite 159 siehe Seite 160, rechte Spalte - Seite 161, linke Spalte siehe Seite 166 ----	1
X	WO 95 06470 A (MERCK & CO INC) 9. März 1995 siehe Seite 1, Spalte 5-13; Ansprüche 1-4,6-10 ----	1
X	WO 96 19987 A (JANSSEN PHARMACEUTICA NV) 4. Juli 1996 siehe Seite 4, Spalte 23-30 siehe Seite 7, Spalte 31-35 siehe Seite 8, Zeile 37 - Seite 9, Zeile 4 siehe Seite 9, Zeile 19-24; Ansprüche 1,2,10 ----	1
X	WO 94 02518 A (UNIV KANSAS) 3. Februar 1994 siehe Seite 19, Absatz 3 siehe Seite 3, Absatz 4 - Seite 5, Absatz 1; Ansprüche 1,30 siehe Seite 8, Absatz 4 ----	2
X	DATABASE WPI Week 7532 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 75-53053w XP002078580 & JP 50 035315 A (NIPPON KAYAKU KK) , 4. April 1975 siehe Zusammenfassung & JP 50 035315 A (NIPPON KAYAKU KK) 4. April 1975 ----	2
A	WO 96 20184 A (PFIZER) 4. Juli 1996 siehe Seite 1, Zeile 20-29 siehe Seite 32, Zeile 25 - Seite 33, Spalte 9 siehe Seite 34, Zeile 13-20 -----	1

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

In...nationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/02284

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 1 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr. weil Sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
Bemerkung: Obwohl der(die) Anspruch(üche) 1-2 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers bezieht(en), wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.
2. ☒ Ansprüche Nr. weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210
3. ☐ Ansprüche Nr. weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgetaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche der internationalen Anmeldung.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die internationale Recherchenbehörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche der internationalen Anmeldung, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen enthalten:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Gebühren erfolgte ohne Widerspruch.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Innen: sales Aktenzeichen

PCT/EP 98/02284

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9404556 A	03-03-1994	AU 5081593 A CN 1087091 A	15-03-1994 25-05-1994
US 5569452 A	29-10-1996	KEINE	
WO 9506470 A	09-03-1995	AU 7397094 A US 5368404 A	22-03-1995 29-11-1994
WO 9619987 A	04-07-1996	AU 4347796 A CA 2207333 A CN 1171739 A EP 0801564 A FI 972793 A NO 972980 A	19-07-1996 04-07-1996 28-01-1998 22-10-1997 27-06-1997 26-06-1997
WO 9402518 A	03-02-1994	US 5376645 A AU 672814 B AU 4779993 A CA 2119154 A EP 0620828 A JP 6511513 T	27-12-1994 17-10-1996 14-02-1994 03-02-1994 26-10-1994 22-12-1994
WO 9620184 A	04-07-1996	AU 4067795 A BG 100248 A BR 9505995 A CA 2207772 A CN 1133287 A CZ 9503447 A FI 972696 A HU 74672 A JP 10500702 T LV 11325 A LV 11325 B NO 955288 A PL 311997 A SI 9500393 A SK 158795 A US 5770594 A	04-07-1996 31-07-1996 23-12-1997 04-07-1996 16-10-1996 11-09-1996 23-06-1997 28-01-1997 20-01-1998 20-06-1996 20-02-1997 24-06-1996 24-06-1996 30-04-1997 08-01-1997 23-06-1998